

医薬分析用紫外可視分光光度計： USP38章<857>準拠Evolution分光光度計

Gordon A. Bain, PhD, Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA

キーワード：分光光度計、UV-Vis、紫外可視、薬局方、コンプライアンス、USP、Evolution

はじめに

紫外可視分光光度計は、現代の実験室において重要な分析機器となっています。また、規制の対象となる業界では、政府や業界団体によって義務付けられている認証および性能検証手順の遵守がしばしば必要とされます。米国薬局方 (USP) は、米国で製品を販売する製薬会社にとって重要な位置にあり、近年、紫外可視分光光度計の試験について更新されたUSP<857>には「紫外可視分光光度計の検証手続きの目的は、実際の使用条件下での試験手順の適合性を実証することである。紫外可視手順の適合性を検証する性能特性は、他の分析手順に要求されているものと同様であると記載されています。

米国薬局方 (USP) 38章<857>紫外可視分光法

- 2016年5月、紫外可視分光光度計の性能検証 (PV) に関する新しいガイドラインおよび要件がUSP<857>として施行されました。
- USP<857>には、特定の試験方法の要求、試験のための測定回数の指定、およびこれらの試験を実施するためのより広範囲の推奨試料など、詳細な内容が含まれます。
- USPIはさらなる明確化および説明を提供することを目的とする提案テキスト [USP (42) 857 1857 2016 Proposed] を配布しました。USP<857>のさらなる更新は2017年10月の予定です。

新規要件の解釈

USP<857>ガイドライン、要件および提案された修正を徹底的に確認しました。本ホワイトペーパーの目的は、Thermo Scientific™ INSIGHT™ ソフトウェアで実行されるThermo Scientific™ Evolution™ 201/220/260 Bio 紫外可視分光光度計の使用に関するコンプライアンスサポート情報を提供するとともに、新しい要件の概要および追加の説明を提供することです。

USP<857>に記載の試験で改訂されたパラメーター：

1. 波長正確度および再現性
2. 測光正確度および再現性
3. 迷光
4. 分解能



PCコントロール付きEvolution 201 紫外可視分光光度計

1. 波長正確度および再現性

USP<857>では、試験機器を用いて試験試料を分析するために使用されている紫外可視スペクトルの波長領域において、波長の正確度および再現性を試験することが必要です。

紫外可視スペクトルの領域とは、正確には「意図された操作範囲」を指します。

1. ピーク位置は6回の測定値の平均として報告すること
2. 200~400 nmの領域の正確度は±1 nm以上であること
3. 400~900 nmの領域の正確度は±2 nm以上であること
4. すべての波長における再現性は<0.5 nmであること
 - a. 「有効」テキストでは、6回の測定値の標準偏差が<0.5 nmである必要がある
 - b. 「提案」テキストでは、平均値からの最大偏差が0.5 nm未満である必要がある
5. 紫外可視領域における機器の波長正確度は、以下のいずれかを使用して試験されるものとする
 - a. 過塩素酸溶液中の酸化ホルミウム^aの241.1 nm~640.5 nmにある特定波長^b
 - b. Hgランプにおける253.7 nm~579.1 nm (Hg)^cの原子輝線、もしくはD₂ランプにおける486.0 nm~656.1 nmの原子輝線
6. 試験試料が635 nm以上で測定される場合、730 nm以上での波長正確度はジジミウム溶液^dを使用して試験する必要がある

USP<857>では、溶液または原子輝線の代替として、ホルミウムまたはジジミウムの希土類金属酸化物を含むガラスフィルターを使用するオプションが許可されており、「市販のトレーサブルCRM（認定参照試料）が使用できる」と記載されています。

- a. 酸化ホルミウムを含むガラスフィルターの使用は、可能とされています。校正ホルミウムガラスにおける最小波長は一般に279.3 nmです。より短い波長を試験試料測定に使用する場合は、ホルミウム溶液（最小波長241 nm）の選択が好ましいです。
- b. 異なる標準物質について必要とされる試験波長の詳細については、付録Aをご参照ください。
- c. 有効なテストでは、「ランプは分光光度計の光源位置に配置する必要があると記載されています。Evolution 200シリーズ分光光度計のHgランプは、通常のビームの光路上に配置されていますが、光源位置には配置されていないため、厳密な解釈をする場合は、要件に準拠していないことを意味します。
- d. プラセオジウムとネオジウムの混合物。
- e. INSIGHTソフトウェアのバージョン2.2では、新しい試験方法が導入されました。バージョン2.3では、試験の部分的な自動化の利便性がさらに向上しました。
- f. Operational Qualification（運転時適格性評価）。

コンプライアンスのサポート

1. 635 nmを超える波長で試験試料を測定する場合、ジジミウム標準物質による性能検証が必要になります。すべての試験試料測定が635 nm以下で実行される場合は、ジジミウムでテストする必要はありません。
2. INSIGHTソフトウェアのバージョン2.3^e以降は、新しいUSP要件に従ってすべてのテストを実行します。

注：ホルミウム標準物質やジジミウム標準物質が必要な場合は、Evolution分光光度計用に提供されているINSIGHTソフトウェアのThermo Scientific™ Validator/パッケージに含まれている校正済みのホルミウムおよびジジミウムガラスフィルターを使用することができます。波長正確度と再現性のテストで利用可能な溶液については、付録Bをご参照ください。

2. 測光正確度および再現性

USP<857>において、ユーザーは「必要な波長と測光（吸光度）範囲について、意図された操作範囲におけるシステムの測光正確度を検証する」必要があると記載されています。紫外光領域では、0.001 M過塩素酸中の重クロム酸カリウム溶液を使用し、1 A未満の吸光度範囲では認証値に対して±0.010 A、1 Aを超える場合は±1%の測光正確度を満たす必要があります。有効テキストには、「0~200 mg/Lの濃度範囲の重クロム酸カリウム溶液は、認証波長235、257、313、または350 nmのいずれかにおいて、最大3吸光度単位までの参照値を提供すると記載されています。USP提案テキストでは、「吸光度OQ^fの管理では、0~1 A領域において、各波長で少なくとも一つの評価を含める必要がある。1 Aを超える吸光度を定量に使用する場合は、吸光度の管理も1~3 Aの範囲で評価する必要があると記載されています。

本文には、意図した操作範囲にわたる測光正確度の検証が必要であると記載されていますが、操作範囲によっては3 Aまでの吸光度正確度のテストは必要ありません。この試験を実施するための参照試料溶液が、入手可能であることが述べられていることにご留意ください。つまり、ラボで受け入れる試験試料の実際の測光範囲を反映する標準試料を選択する必要があります。

USP<857>では、測光再現性を次のように測定する必要もあります。「測光再現性は、動作範囲にわたる二つ以上の吸光度レベルでの少なくとも6回の繰り返し測定の標準偏差として決定できる(表1)。標準偏差は、±0.5% A (1.0 Aを超える値の場合) または±0.005 Aを超えてはならない」

表1. 「提案された」測光正確度と再現性のメソッドのアップデート

吸光度レベル	紫外可視領域	USP<857>2015要件
<1 A	200~400 nm	60 mg/L 重クロム酸カリウム溶液
<1 A	400~800 nm	NIST標準NDガラスフィルター 波長440, 546.1, 590, 635 nm
≤1 A	430 nm*	600 mg/L 重クロム酸カリウム溶液
1 A~3 A	200~400 nm	最大200 mg/L 重クロム酸カリウム溶液
1 A~3 A	400~800 nm	NIST標準NDガラスフィルター 波長440, 546.1, 590, 635 nm

*ヨーロッパ薬局方も推奨

提案テキストでは、基準を同じに保ちながら、標準偏差ではなく平均からの最大偏差を測定するという要件が提案されています。

コンプライアンスのサポート

- 1 Aを超える試料溶液を測定する場合、少なくとも2種類の重クロム酸カリウム溶液が必要です。
- 400 nmを超える波長での測定には、NDフィルター(減光フィルター)のセットが必要になります。
- INSIGHTソフトウェアまたはThermo Scientific™ INSIGHTsecurity™ソフトウェアのユーザーは、INSIGHT 2.3以降にアップグレードする必要があります。このバージョンは、新しいUSP要件に従ってテストを実行します。

注:重クロム酸カリウム溶液は、四つの異なる波長で四つの異なる吸光度レベルの測光値を提供します。単一の標準物質の測定で報告された種々のレベルの測光正確度が維持されていることを示すだけで十分な場合がありますが、監査者の判断に依存する可能性が高いため、ラボによっては二つの異なる重クロム酸溶液を準備する場合があります。

NDフィルター(減光フィルター)の場合、二つの異なるフィルターをテストする必要があります。波長正確度と再現性のテストで利用可能な標準溶液については、付録Bをご参照ください。

3. 迷光

概要:USP<857>では、以前のバージョンで必要とされたものと比較して、迷光の試験を行うために使用できる標準溶液の数が拡充されました。

また、ミエレンツ法と呼ばれる迷光を測定するための新しい方法が導入されています。この方法では、リファレンスポジションに同じ標準液を含む5 mmセルを使用します。ミエレンツ法は、特に光電子増倍管(PMT)検出器、非常に低レベルの迷光、または非常に限られた測定範囲を備えた機器で、迷光をより正確に測定できますが、Evolution分光光度計を使用する場合は必要ありません。

脱イオン水に対して基準となる10 mmセルを使用して迷光を直接測定すると、迷光レベルが必要な制限を下回っているかどうかわかります。これについては、USP<857>内で、「別法として、分析者は指定されたフィルター(表2)の吸光度を適切な基準に対して測定し、最大吸光度値を記録することができると記載されています。従来の直接測定を許容することも、提案テキストでより詳細に述べられています。これは、各材質で使用される測定波長について述べ、迷光を測定するための二つの実施可能な手順を明確に説明しています。

表2. 標準試料と試験波長の選択

推奨試験波長 (nm)	スペクトル範囲	液体または溶液
198	190~205	塩化カリウム水溶液 (12 g/L)
220	210~259	ヨウ化ナトリウム水溶液またはヨウ化カリウム (10 g/L)
300	250~320	アセトン
340	300~385	亜硝酸ナトリウム水溶液 (50 g/L)

提案テキストにおいて、USPでは「迷光OQの限界では、必要な動作範囲において上記の表2に示す適切な材料を選択することにより、一つまたは複数の紫外波長での評価を行う必要がある。分析者は、適切な参照試料を選択し、PQ (Performance Qualification、性能適格性確認) の一部として迷光のレベルを監視する必要がある」と述べています。重要な点は、USPが目的の測定試料の波長、つまり「必要な操作範囲」における迷光テストの実施を明記していることです。

可視光領域では、試験に使用できる推奨試料がないため、この要件を満たすことはできません。紫外領域では、上記の表2から適切な溶液を選択できます。USP<857>は、「分析者はPQの一部として適切な波長で迷光のレベルを監視する必要がある」と述べていますが、実践方法については指定していないためです。

コンプライアンスのサポート

1. 既存の迷光標準溶液を引き続き使用できます。
2. INSIGHTソフトウェアであらかじめプログラムされた迷光パフォーマンス検証 (PVテスト) を引き続き使用できます。
3. 追加の5 mm光路長セルを必要とするミエレンツ法は、USPでは必要ありません。

注: 迷光溶液は校正できません。少なくとも2 Aへの吸収を有する適切な材料を含む密封キュベットまたはボトルの認証は、波長または吸光度標準で実行される校正と同じではありません。

1. 有効テキストには、ユーザーはどの迷光基準が「適切」であるかを判断できると記載されています。現在の規格を継続して使用することをお勧めします。
2. 塩化カリウム、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム、および亜硝酸ナトリウムの密封標準溶液は、市販品を購入するか、新しい溶液を実験室にて調製することができます。試薬グレードのアセトンは、ボトルから直接使用することができます。認定された参照資料 (CRM) を使用する必要はありません。私たちの研究室で行われた実験では、市販品のアセトンで、300 nmにおいて密封されたCRMと同じ結果が得られました。
3. 繰り返し測定する必要はありません。1 nmまたは2 nmのスペクトルバンド幅 (SBW)、1秒の積算時間での固定波長測定を行います。



Smart サーモスタットリニア8セルチェンジャーアクセサリ

g. 性能適格性評価

4. 分解能

概要: 分解能は、間隔の狭いピークを分離し、ピークの高さを正確に測定する光学系の性能の一つの尺度です。スペクトルバンド幅 (SBW) としても知られる分解能の測定方法に変更はありません。試験は、ヘキサンプラックに対してヘキサン溶液中の0.02%トルエンを使用して実行されます。

USP<857>は、「ほとんどの薬局方の定量測定では、2 nmのスペクトルバンド幅で十分である」と述べています。ただし、「ベンゼノイド化合物または鋭い吸収バンド (半値幅が15 nmよりも小さい) を持つ他の化合物で正確な吸光度測定を行う必要がある場合は、使用する分光光度計のスペクトル帯域幅は、化合物の吸収バンドの半値幅の1/8を超えてはならない」との記載もあります。

USPの医薬品各条は、分析のための特定のSBW条件を示していません。したがって、そのような特定の指示がない場合、ユーザーはすべての測定で1 nmのSBWで測定することが期待されています。一方、SBWを大きくすると検出器への光量 (信号強度) が増加し、たとえば1.5 nmまたは2 nm SBWで測定した場合、測光性能が向上することが期待されます。

コンプライアンスのサポート

注: ヘキサン試験溶液中のトルエンは校正できません。標準試料のサプライヤーは、さまざまな既知のスペクトル帯域幅で測定したときに正しく機能するように、適切な材料を含む密封キュベットを認定することができます。この溶液の調製には高い精度が必要であり、いずれの溶液も揮発性が高いため、保管寿命が短くなります。そのため、密封されたCRMキュベットの購入をお勧めします。

- 既存の迷光標準溶液は引き続き使用することができます。
- INSIGHTソフトウェア (Evolution 201/220/260 Bio分光光度計) であらかじめプログラムされた迷光PVテストを引き続き使用することができます。

USP<857>での試験を実行するために必要な標準の数は、7ポジションカラーセルのホルダー数よりも多くなっています。多数の標準を試験するためには、Thermo Scientific™ Evolution™ Smartサーモスタットリニア8セルチェンジャーアクセサリが便利です。

USP<857>準拠PVテスト用INSIGHTソフトウェアのアップデート

INSIGHTソフトウェアは、引き続きパフォーマンス検証 (PV) アプリケーションを使用してこれらのテストを実行できます。新しいINSIGHT v2.3ソフトウェアは、一度に一つずつ標準を測定するための正しいテスト方法を提供し、セルチェンジャーアクセサリを使用して複数の試料の半自動テストを提供します。以下は、PVテストをサポートするために開発されたINSIGHTソフトウェアアップデートのいくつかの画面例です。

USP<857>に従って設定された試験用の新しいテストセット

Run

Automated testing with 7 cell changer.

Select testing methodology
USP 2015

Run	Tests	Estimated total time: 00:10:25 (hh:mm:ss)
<input type="checkbox"/>	Photometric Accuracy and Repeatability (K2Cr2O7)	
<input checked="" type="checkbox"/>	Wavelength Accuracy and Repeatability Holmium Solution...	
<input type="checkbox"/>	Wavelength Accuracy and Repeatability Holmium Glass. It...	
<input type="checkbox"/>	Wavelength Accuracy and Repeatability Didymium Solutio...	
<input checked="" type="checkbox"/>	Resolution (Toluene/Hexane)	
<input type="checkbox"/>	Stray Light (KCl, 198 nm)	
<input checked="" type="checkbox"/>	Stray Light (KI/NaI, 220 nm)	
<input type="checkbox"/>	Stray Light (NaNO2, 340 nm)	
<input type="checkbox"/>	Stray Light (Acetone, 250 nm)	
<input type="checkbox"/>	Photometric Noise: 2A (260 nm)	
<input type="checkbox"/>	Photometric Noise: 1A (260 nm)	
<input type="checkbox"/>	Photometric Noise: 0A (260 nm)	
<input type="checkbox"/>	Wavelength Accuracy (Hg lamp)	
<input type="checkbox"/>	Wavelength Repeatability (Hg lamp)	
<input type="checkbox"/>	Baseline Flatness (Abs, 800-200 nm)	
<input type="checkbox"/>	Photometric Drift	

標準試料の証明値を入力するための新しいダイアログボックス

K2Cr2O7 standards details dialog

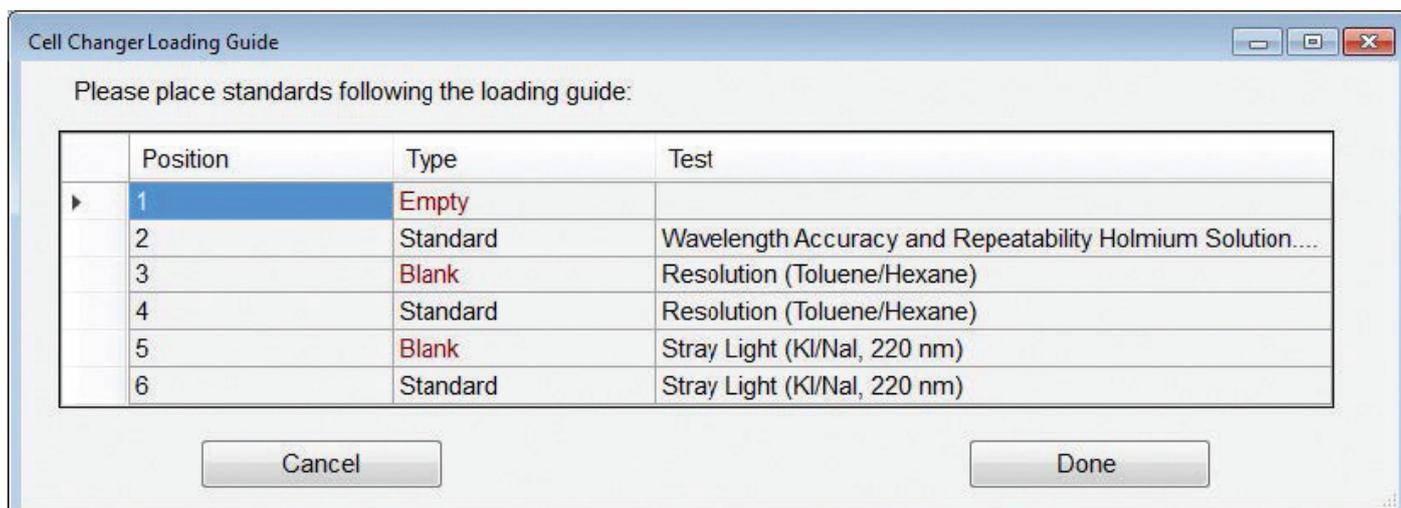
Number of standards: 2

	350 (nm)	313 (nm)	257 (nm)	235 (nm)	Concentration
Standard 1	0.7410	0.8620	0.2890	0.6340	60 (mg/L)
Standard 2	1.7250	2.0050	0.6730	1.4770	140 (mg/L)

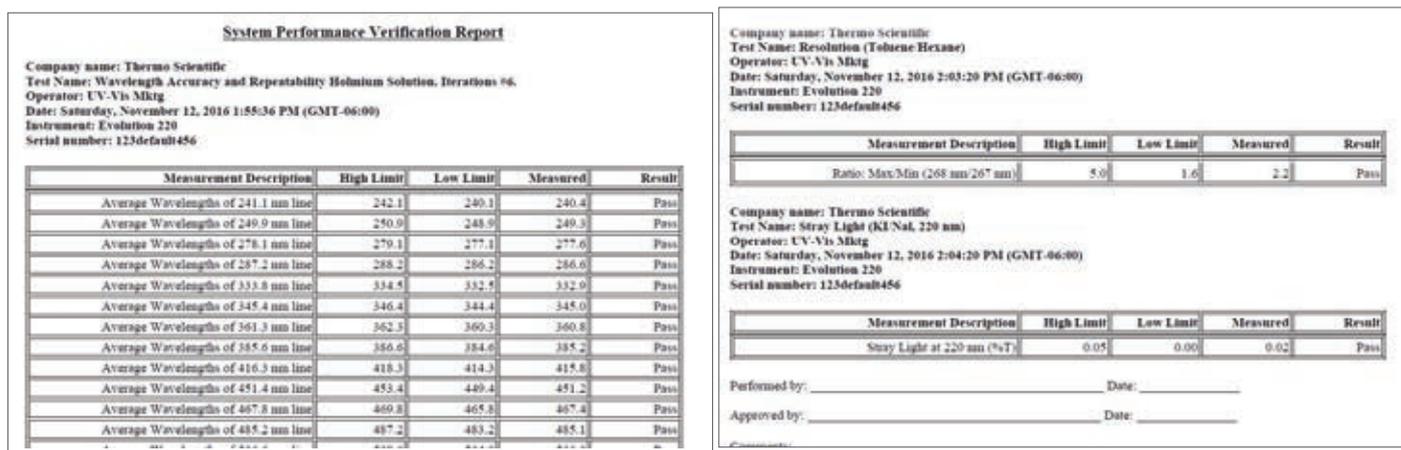
Cancel Ok

自動テストの新しい実行ガイド

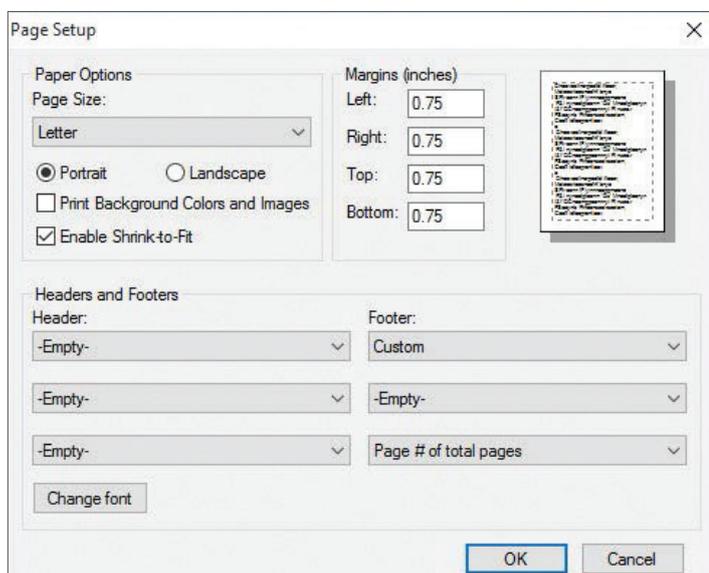
テストをグループとして実行できるように、セルチェンジャーにデータを入力する方法をユーザーに示します。



すべてのデータは、実行中のPVアプリケーションに保持されます。テスト結果一式が、単一のレポートにまとめられます。



カスタムヘッダー、フッター、ウォーターマークを追加するオプションがあります。



付録A:

USP<857>2015で求められている標準物質の参考値

波長正確度標準におけるピークの波長

吸光度モードで測定されたすべてのピーク

標準	ピーク波長 (nm)
酸化ホルミウム溶液	241.1、249.9、278.1、287.2、333.5、345.4、361.3、385.6、416.3、451.4、467.8、485.2、536.6、640.5
ジジミウム溶液	731.6、740.0、794.1、799.0、864.4
酸化ホルミウムガラス	241.5、279.2、287.5、333.8、360.9、418.8、445.8、453.7、460.2、536.5、637.7

NDグラスフィルターの可視光領域におけるNISTトレーサブル測光値の波長:

440、465、546.1、590および635 nm

重クロム酸カリウム溶液の吸光度値の例、製品番号 (PN) 840-288900に含まれる60 mg/Lおよび140 mg/L溶液

濃度 (mg/L)	235 nm	257 nm	313 nm	350 nm
60	0.7410	0.8620	0.2890	0.6340
140	1.7250	2.0050	0.6730	1.4770

波長正確度および測光正確度のための適切な標準物質の選択

標準物質の選択は、標準物質の校正精度、および機器の規定された性能レベル（製造者の仕様）にも影響されます。このトピックに関する特定の文章は、2016年に提案されたガイドラインに由来し、現時点では有効ではありません。これは、「上記に列挙されたすべての手順について、適切な校正のための許容限界は、必要な波長で、CRMの拡張された不確かさを機器メーカーの仕様に追加することによって確立される」と解釈することができます。

付録B:

入手可能な標準物質

波長正確度用ジジミウムフィルター

- 640 nm以上の試料を測定する場合
- 測定では、測定される波長の上下の波長で波長正確度を検証すること

校正済みジジミウムガラスフィルター製品

- 840-285200 UV-Vis 適格フィルターキット、校正済み
- 840-248700 Validator-INSIGHTソフトウェア (米国)
- 840-248800 Validator-INSIGHTソフトウェア (A4)
- 840-266800 波長標準-ジジミウムガラス
- 840-253200 波長標準、ホルミウム、ジジミウム

校正済みジジミウム溶液

- 840-284300 ジジミウム密封および校正波長標準

重クロム酸カリウム溶液100 mg/L~200 mg/L (測光正確度および再現性用)

- ユーザーが紫外光領域において吸光度値>1 Aで試験試料を測定する場合に必要な
- 測定では、測定される試験試料の限界まで測光正確度を検証

60 mg/Lおよび140 mg/L、一般的なブランクに対して測定

- 840-288900 紫外光領域測光正確度標準 (USP-2015用、2 A)
- 840-289000 液体標準液セット (EPおよびUSP-2015用)

100 mg/L~200 mg/Lセル、中~高吸光度範囲の用途向け、特定のブランクに対して測定

製品番号	濃度 (mg/L)	235 nm	257 nm	313 nm	350 nm
840-288300	100	1.2430	1.4480	0.4800	1.0690
840-288400	120	1.4820	1.7240	0.5780	1.2680
840-288500	140	1.7250	2.0050	0.6730	1.4770
840-288600	160	1.9920	2.3180	0.7700	1.7060
840-288700	180	2.2350	2.5990	0.8650	1.9150
840-288800	200	2.4860	2.8960	0.9600	2.1380

重クロム酸カリウム溶液、5種類、NIST標準

- PN9423UV95200E 0、20、40、60、80、100 mg/L

校正済NDフィルター、400 nm~700 nm

- ユーザーが400 nmを超える試験試料を測定する場合に必要な
- 測定では、測定される試験試料の吸光度までの測光正確度を検証

校正済NDフィルター、0.5 A、1 A、1.5 Aおよび2 A

- 840-285200 UV-Vis 適格フィルターキット、校正済み (バリデーション用IQ/OQ製品に含まれます)

校正済みNDフィルター (6フィルター、0.3 A~2 A)

- 840-253000 測光正確度および直線性テストキット

従来のUSPではヨウ化カリウムのみが選択肢

新USP<857>では、迷光試験のために、以下の参照試料のいずれかが必要です

KCl 190~205 nm 198 nmで測定	9423U95520E	迷光フィルター 塩化カリウム、KCl
	840-289000	液体標準セット EPおよびUSP<857>
NaI 210~259 nm 220 nmで測定	9423U95500E	迷光フィルター、 ヨウ化ナトリウム、NaI
アセトン 250~320 nm 300 nmで測定	840-284400	アセトン迷光標準 および ブランク
硝酸ナトリウム 300~385 nm 340 nmで測定	222-226500	迷光標準液、 硝酸ナトリウム

参考文献:

1. United States Pharmacopeia 38 Chapter <857> Ultraviolet-Visible Spectroscopy
2. United States Pharmacopeia (42) 857 1857 2016 Proposed

詳細はこちらをご覧ください [thermofisher.com/uv-vis](https://www.thermofisher.com/uv-vis)

© 2021 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.
All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.
実際の販売価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。
価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。
標準販売条件はこちらをご覧ください。 [thermofisher.com/jp-tc](https://www.thermofisher.com/jp-tc) **UV034-A2103OB**

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

分析機器に関するお問い合わせはこちら

TEL: 0120-753-670 FAX: 0120-753-671

Analyze.jp@thermofisher.com

facebook.com/ThermoFisherJapan

@ThermoFisherJP

[thermofisher.com](https://www.thermofisher.com)